

敲低核纤层蛋白B1通过抑制PI3K/AKT通路在肝癌中发挥抑癌作用

展沙沙¹, 范琪琪², 李雪³ (1. 青岛市第六人民医院 老年医学科, 山东 青岛 266011; 2. 青岛市第六人民医院 肝病一科, 山东 青岛 266011; 3. 青岛市第六人民医院 肿瘤内科, 山东 青岛 266011)

摘要: 目的 探讨核纤层蛋白B1 (lamin B1, *LMNB1*) 对肝癌进展的影响, 发掘肝癌新的治疗靶点。方法 利用工具网站基因表达水平值的交互式分析平台 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 分析癌症基因组图谱数据库 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 中肝癌组织及癌旁组织*LMNB1*的表达水平, 使用Kaplan-Meier分析*LMNB1*表达水平差异对肝癌患者预后的影响。采用实时定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测正常肝细胞系及肝癌细胞系中*LMNB1*表达水平。选取*LMNB1*表达水平较高的两种人肝癌细胞株Hep3B、HepG2, 转染小干扰RNA敲低*LMNB1*表达, 在*LMNB1*表达水平较低的细胞SUN475中构建*LMNB1*稳定过表达细胞系并使用Western blot验证转染效率, 采用CCK8法检测敲低或过表达*LMNB1*后肝癌细胞的增殖能力, 采用平板克隆形成检测敲低或过表达*LMNB1*后细胞形成克隆的能力。采用Transwell检测敲低或过表达*LMNB1*后细胞侵袭及迁移能力的变化。采用Western blot实验检测磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK) 及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的变化。结果 TCGA数据库分析表明肝癌组织中*LMNB1*表达水平较癌旁正常组织高 ($P < 0.05$), 且*LMNB1*表达水平与肝癌患者预后呈负相关 ($P = 0.003$)。实时定量PCR显示相对正常人肝细胞系, 肝癌细胞中*LMNB1* mRNA表达量分别为MHCC97H: 1.80 ± 0.10 ($t = 11.08$, $P < 0.001$); SUN475: 1.29 ± 0.03 ($t = 5.88$, $P = 0.004$); HepG2: 2.97 ± 0.04 ($t = 39.68$, $P < 0.001$); PLC/Prf/5: 1.74 ± 0.04 ($t = 14.51$, $P < 0.001$); HuH7: 1.70 ± 0.02 ($t = 15.22$, $P < 0.001$); SK-HEP-1: 1.59 ± 0.05 ($t = 11.17$, $P < 0.001$); Hep3B: 2.27 ± 0.09 ($t = 18.50$, $P < 0.001$); 均显著高于正常人肝细胞系。Western blot结果显示在HepG2及Hep3B细胞系中, 与siScramble阴性对照组相比, 转染siLMNB1实验组的*LMNB1*表达水平显著降低 (HepG2: 0.60 ± 0.10 vs 1.60 ± 0.10 , $t = 11.55$, $P < 0.001$; Hep3B: 0.40 ± 0.10 vs 1.70 ± 0.10 ; $t = 15.61$, $P < 0.001$); 而SUN475中转染质粒后*LMNB1*表达显著增加 (0.70 ± 0.20 vs 0.07 ± 0.04 ; $t = 5.541$, $P = 0.005$)。敲低*LMNB1*后培养96 h, 与对照组相比, Hep3B (10.81 ± 0.67 vs 15.48 ± 0.62 ; $t = 8.86$, $P < 0.001$) 及HepG2 (9.45 ± 0.61 vs 17.08 ± 0.75 ; $t = 13.67$, $P < 0.001$) 细胞增殖能力被显著抑制; 而在SUN475中过表达*LMNB1*后, 实验组细胞增殖活性显著增加 (16.94 ± 1.52 vs 12.65 ± 1.06 ; $t = 3.99$, $P = 0.016$)。在HepG2及Hep3B细胞系中敲低*LMNB1*后, 细胞克隆形成数显著减少 [HepG2: (90.30 ± 7.24) 个 vs (382.01 ± 25.27) 个, $t = 19.24$, $P < 0.001$; Hep3B: (128.03 ± 8.24) 个 vs (395.85 ± 28.27) 个, $t = 15.76$, $P < 0.001$], 在SUN475中过表达*LMNB1*组比对照组克隆形成个数显著增加 [(467.82 ± 42.45) 个 vs (85.31 ± 15.32) 个; $t = 14.87$, $P = 0.001$]。在HepG2及Hep3B细胞系中敲低*LMNB1*后, 肝癌细胞迁移数量显著减少 [HepG2: (75.25 ± 8.10) 个 vs (15.02 ± 3.50) 个, $t = 11.90$, $P < 0.001$;

Hep3B: (168.20 ± 12.26) 个 vs (34.83 ± 7.61) 个, $t = 15.96$, $P < 0.001$], 侵袭的细胞数量同样显著减少 [HepG2: (110.21 ± 12.01) 个 vs (25.76 ± 4.03) 个, $t = 11.50$, $P < 0.001$; Hep3B: (150.22 ± 15.16) 个 vs (22.03 ± 14.26) 个, $t = 10.65$, $P < 0.001$]; 在SUN475中, 过表达 $LMNB1$ 组比对照组细胞迁移数量显著增加 [(50.11 ± 5.55) 个 vs (349.85 ± 25.26) 个; $t = 11.33$, $P < 0.001$], 侵袭的细胞数量同样显著增加 [(40.11 ± 5.26) 个 vs (80.13 ± 12.20) 个; $t = 5.21$, $P = 0.007$]。与对照组相比, 敲低 $LMNB1$ 后, AKT的磷酸化活性形式p-AKT表达水平显著下降, 而过表达 $LMNB1$ 可导致p-AKT表达升高(P 均 < 0.05)。而敲低或过表达 $LMNB1$ 后, p-ERK表达水平无显著变化, AKT和ERK的本底表达水平均未发生明显变化。**结论** 抑制 $LMNB1$ 可通过抑制PI3K/AKT信号转导通路的激活抑制肝癌的发生发展, 可作为诊断肝癌的生物标记物和潜在的治疗靶点。

关键词: 肝癌; 核纤层蛋白B1; PI3K/AKT信号转导通路

Lamin B1 downregulation plays a tumor suppressive role on liver cancer by inhibiting the PI3K/Akt pathway

Zhan Shasha¹, Fan Qiqi², Li Xue³ (1.Department of Geriatric Medicine, The Sixth People's Hospital of Qingdao, Qingdao 266011, Shandong Province, China; 2.Department of Liver Disease, The Sixth People's Hospital of Qingdao, Qingdao 266011, Shandong Province, China; 3.Department of Medical Oncology, The Sixth People's Hospital of Qingdao, Qingdao 266011, Shandong Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of $LMNB1$ on the progression of hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore new therapeutic targets for HCC. **Methods** The expression level of $LMNB1$ in HCC tissues and normal tissues in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were analyzed by Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) website, and Kaplan-Meier curve was used to analyze the effect of $LMNB1$ expression on prognosis. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression level of $LMNB1$ in normal liver cell lines and HCC cell lines. Two human HCC cell lines Hep3B and HepG2 with higher expression levels of $LMNB1$ were selected and transfected with small interfering RNA to knockdown $LMNB1$ expression, $LMNB1$ stable overexpression cell lines were constructed in SUN475 cells with low level of $LMNB1$ expression and the transfection efficiency was verified by Western blot. The proliferation capacity of HCC cells after knockdown or overexpression $LMNB1$ was measured by CCK8 assay, and plate clone formation assay was used to detect the ability of clone formation of the cells. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated protein kinase B (p-AKT), protein kinase B (AKT), phosphorylated extracellular regulated protein kinases (p-ERK) and extracellular regulated protein kinases (ERK). **Results** The results of TCGA database showed that the expression level of $LMNB1$ was higher in HCC tissues than that of normal tissues ($P < 0.05$), and the expression level of $LMNB1$ was negatively correlated with the prognosis of patients with HCC ($P = 0.003$). Real-time quantitative PCR showed that compared with the normal human liver cell lines, the mRNA expression level of $LMNB1$ in MHCC97H (1.80 ± 0.10 ; $t = 11.08$, $P < 0.001$), SUN475 (1.29 ± 0.03 ; $t = 5.88$, $P = 0.004$), HepG2 (2.97 ± 0.04 ; $t = 39.68$, $P < 0.001$), PLC/Prf/5 (1.74 ± 0.04 ; $t = 14.51$, $P < 0.001$), HuH7 (1.70 ± 0.02 ; $t = 15.22$, $P < 0.001$), SK-HEP-1 (1.59 ± 0.05 ; $t = 11.17$, $P < 0.001$) and Hep3B (2.27 ± 0.09 ; $t = 18.50$, $P < 0.001$) were significantly higher than those in normal human liver cell lines. Western blot showed that in HepG2 and Hep3B cell lines, the expression level of $LMNB1$ in the si $LMNB1$

group reduced significantly compared to that of the siScramble control group (HepG2: 0.60 ± 0.10 vs 1.60 ± 0.10 ; $t = 11.55$, $P < 0.001$; Hep3B: 0.40 ± 0.10 vs 1.70 ± 0.10 ; $t = 15.61$, $P < 0.001$). The expression of *LMNB1* increased significantly after transfection of the plasmid in SUN475 (0.70 ± 0.20 vs 0.07 ± 0.04 ; $t = 5.541$, $P = 0.005$). After *LMNB1* knockdown and cultured for 96 h, the proliferation ability of Hep3B (10.81 ± 0.67 vs 15.48 ± 0.62 ; $t = 8.86$, $P < 0.001$) and HepG2 (9.45 ± 0.61 vs 17.08 ± 0.75 ; $t = 13.67$, $P < 0.001$) cells were significantly inhibited compared with the control group, however, after the overexpression of *LMNB1* in SUN475, the cell proliferation activity was significantly increased in the experimental group (16.94 ± 1.52 vs 12.65 ± 1.06 ; $t = 3.99$, $P = 0.016$). After *LMNB1* knockdown in HepG2 and Hep3B cell lines, the number of cell clone formation decreased significantly (HepG2: 90.30 ± 7.24 vs 382.01 ± 25.27 , $t = 19.24$, $P < 0.001$; Hep3B: 128.03 ± 8.24 vs 395.85 ± 28.27 , $t = 15.76$, $P < 0.001$). In SUN475, *LMNB1* overexpression significantly increased the number of clones compared with control group (467.82 ± 42.45 vs 85.31 ± 15.32 , $t = 14.87$, $P = 0.001$). After *LMNB1* knockdown in HepG2 and Hep3B cells, migration (HepG2: 75.25 ± 8.10 vs 15.02 ± 3.50 , $t = 11.90$, $P < 0.001$; Hep3B: 168.20 ± 12.26 vs 34.83 ± 7.61 , $t = 15.96$, $P < 0.001$) and invasion (HepG2: 110.21 ± 12.01 vs 25.76 ± 4.03 , $t = 11.50$, $P < 0.001$; Hep3B: 150.22 ± 15.16 vs 22.03 ± 14.26 , $t = 10.65$, $P < 0.001$) of HCC cells decreased significantly. In SUN475, after *LMNB1* overexpression, migration (50.11 ± 5.55 vs 349.85 ± 25.26 ; $t = 11.33$, $P < 0.001$) and invasion (40.11 ± 5.26 vs 80.13 ± 12.20 ; $t = 5.21$, $P = 0.007$) of the cells increased significantly. Compared with the control group, *LMNB1* knockdown resulted in a significant decrease in the phosphorylation activity form of AKT (p-AKT expression level), while overexpression of *LMNB1* resulted in an increase in p-AKT expression (all $P < 0.05$). After knocking down or overexpressing *LMNB1*, there was no significant change in the expression level of p-ERK, and there were no significant change in the background expression levels of AKT and ERK. **Conclusions** Inhibition of *LMNB1* can inhibit the occurrence and development of HCC by inhibiting the activation of PI3K/Akt signaling pathway, which can be used as a new biomarker for diagnosis of liver cancer and a potential therapeutic target.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Lamin B1; PI3K/AKT signaling transduction pathway

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,已成为全球范围内严重的健康负担^[1,2]。根据2022年国家癌症中心发布的最新全国癌症统计数据,肝癌已成为第四位发病率较高的癌症^[3]。肝癌的发生是一个涉及多种因素的复杂过程^[4]。肝癌的危险因素在全球分布并不均衡,在中国和印度等发展中国家,慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染和黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)是主要危险因素^[5-7]。而在发达国家,肝癌主要由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的肝硬化和酒精性脂肪性肝病发展而来^[8]。到目前为止,应用于临床并广泛使用的治疗方法有手术切除、肝移植、射频消融术(radio frequency ablation, RFA)、皮下注射乙醇(percutaneous ethanol injection, PEI)和经动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization,

TACE)^[9,10]。尽管治疗手段多样,但由于肝癌起病隐匿,患者大多在病程晚期才被确诊,且肝癌侵袭能力强,极易转移和复发^[11,12],这对肝癌患者的早期诊断及治疗造成了极大的困难^[13]。人核纤层蛋白B1基因所编码的核纤层蛋白B1(lamin B1, LMNB1)是形成核膜的关键组分,也是核基质的基础蛋白之一^[14],在核膜稳定性、基因表达调控和神经发育中发挥重要作用。LMNB1蛋白还参与许多细胞生理活动,包括DNA复制和转录、抗氧化应激、染色体分布、细胞核和染色质组织、细胞周期调节、细胞发育和分化、核迁移和核自噬^[15]。有研究表明LMNB1基因重复或错义突变导致LMNB1表达上调,与常染色体显性遗传成人型脑白质营养不良有关^[16]。最新研究表明,LMNB1蛋白在肿瘤中同样发挥重要作用,但LMNB1蛋白在肝癌发生发

展中的作用及其机制尚不完全明确。本研究旨在揭示LMNB1蛋白表达对肝癌细胞的生物学意义及其内在机制,并探究LMNB1蛋白是否有望成为治疗肝癌的新靶点。

1 资料与方法

1.1 材料和试剂 人正常肝细胞系HL-7720、人肝癌细胞系MHCC97H、SUN475、HepG2、PLC/prf/5、Huh7、Hep3B、SK-HEP-1购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC);胎牛血清购自美国Gibco公司, RPMI-1640培养基、胰酶、结晶紫等购自北京索莱宝生物科技有限公司;Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司, siScramble、siLMNB1购自湖南丰晖生物科技有限公司; mRNA反转录试剂盒、SYBR Mix试剂盒购自北京擎科生物科技有限公司。Anti-LMNB1抗体(#13435)、anti-AKT(#4685)、anti-p-AKT(#4060)、anti-ERK(#4695)、anti-p-ERK(#4370)抗体购自美国CST公司, GAPDH(ab22555)抗体购自英国Abcam公司;二抗兔抗(00028856)购自天津优抗生物公司;RIPA蛋白裂解液、一抗及二抗稀释液、Cell Counting Kit-8(CCK8)、BCA蛋白定量试剂盒, SDS-PAGE预制胶试剂盒、 $1 \times$ TBST洗膜液等均购自中国武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TCGA数据库分析 通过工具网站基因表达水平值的交互式分析平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析癌症基因组图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中369个肝癌样本以及160个癌旁正常肝组织样本中LMNB1的表达水平差异,并生成箱式图。根据LMNB1表达水平中位值,将肝癌患者分为LMNB1高表达水平组及LMNB1低表达水平组,每组各182例。采用Kaplan-Meier分析LMNB1表达水平高低对肝癌患者预后的影响,并生成Kaplan-Meier生存曲线。

1.2.2 细胞培养 本研究所有细胞系均已经短串联重复(short tandem repeat, STR)检测。完全培养基使用10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合物及90%RPMI-1640培养基配制,用于培养人正常肝细胞系HL-7720、人肝癌细胞系MHCC97H、SUN475、HepG2、PLC/prf/5、Huh7、Hep3B、SK-HEP-1,于37℃,95%湿度,5% CO₂的细胞培养箱中培养。每天观察细胞状态,进行换液或传代等处理。

1.2.3 细胞总RNA提取及实时定量聚合酶链式反

应(polymerase chain reaction, PCR) 首先将各细胞系接种于六孔板,孵箱培养24 h后弃去培养液, PBS冲洗3次,每孔加入500 μ l Trizol,轻轻晃动1~2 min后移液枪吸出,采用1.5 ml EP管收集,静置5 min;加入200 μ l氯仿,剧烈震荡40 s。4℃条件下,12000 r/min离心15 min(离心半径20 cm),小心吸取上清,并与等体积异丙醇缓慢混匀,静置10 min。4℃条件下,12000 r/min离心10 min(离心半径20 cm),后小心弃去上清,与1 ml 75%乙醇缓慢混匀,静置1 min。4℃条件下,7500 r/min离心5 min(离心半径20 cm),无酶环境下充分干燥,无菌无酶水溶解RNA沉淀。依据RNA反转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,实时定量qPCR试剂盒严格按照说明书操作,检测LMNB1 mRNA水平。引物序列为:LMNB1正向引物3'-ACATGGAAATCAGTGCTTACAGG-5',反向引物3'-GGGATACTGTACACCGGA-5'; β -actin正向引物3'-CGCGAGAAGATGACCCAGAT-5',反向引物3'-GGGCATACCCCTCGTAGATG-5'。

1.2.4 细胞siRNA转染及稳定细胞系构建 将Hep3B、HepG2细胞分为对照组及实验组,分别接种于六孔板中,根据siRNA说明书配置体系,分别转染siScramble(对照组)和siLMNB1(实验组)。siLMNB1小干扰RNA序列为:5'-GCATTAAAGCAGCGTATC-3'。ovLMNB1病毒购自吉玛基因,将SUN475细胞分为对照组及实验组,分别接种于六孔板中,根据供应商提供的说明书配置体系,分别侵染对照组和实验组。最后通过Western Blot实验检测敲低及过表达细胞中LMNB1表达水平,验证转染效率。

1.2.5 细胞增殖活性的检测 将处于对数生长期的Hep3B、HepG2、SUN475对照组及实验组细胞用胰酶消化后,室温800 r/min离心5 min(离心半径30 cm)后弃上清,加入新的培养液制备细胞悬液,充分吹匀后进行细胞计数,以 2×10^3 /孔接种于96孔板,细胞培养箱中培养。分别于0 h、24 h、48 h、72 h、96 h检测细胞增殖活性。检测试剂由CCK8试剂与无血清RPIM1640按1:10在避光条件下配制,每孔加入100 μ l检测液,细胞培养箱孵育2 h后,使用酶标仪于450 nm波长处检测吸光度值。

1.2.6 Western blot检测 将Hep3B、HepG2、SUN475对照组及实验组细胞用胰酶消化后离心,取细胞沉淀,加入适量细胞裂解液并轻柔吹匀,冰上裂解30 min后,12000 r/min离心15 min(离心半径20 cm)后小心吸取上清,采用BSA标准品法测量蛋白浓

度, 剩余蛋白原液加入Loading bufer, 95 °C煮10 min后待用。电泳(浓缩胶电压为80 V, 分离胶电压为120 V), 转膜(300 mA) 1.5 h, 快速封闭液室温封闭30 min, 一抗(按抗体说明书比例稀释) 4 °C孵育过夜。二抗(按抗体说明书比例稀释) 室温孵育1 h, 1 × TBST洗膜液洗膜后化学发光试剂曝光显色。通过检测肝癌细胞系敲低或过表达*LMNB1*后磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK)及细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)相对于内参GAPDH的表达量, 确定*LMNB1*对肝癌细胞PI3K/AKT通路及MAPK通路活化水平的影响。

1.2.7 克隆形成实验 将处于对数生长期的Hep3B、HepG2、SUN475对照组及实验组细胞制备细胞悬液, 方法同上。充分吹匀后进行细胞计数, 以 2×10^3 /孔接种于6孔板中, 轻轻拍打6孔板各边缘使细胞均匀分布。细胞培养箱常规培养12 d。弃去细胞培养液, PBS小心冲洗, 每孔滴入1 ml 4%多聚甲醛浸泡30 min, 固定细胞, 结晶紫染色30 min。电子显微镜下计数每孔中形成的细胞克隆数(细胞数>50个计为1个有效细胞克隆)。

1.2.8 迁移与侵袭实验 将处于对数生长期的Hep3B、HepG2、SUN475对照组及实验组细胞制备细胞悬液, 方法同1.2.5。充分吹匀后进行细胞计数, 将含有 2×10^4 细胞的无血清培养基接种于涂有(侵袭试验)或不涂(迁移试验)Matrigel胶的transwell小室中, 将小室置于24孔板中, 24孔板注入含10%胎牛血清的培养基500 μ l, 后于细胞孵箱中培养。24 h(迁移实验)或48 h(侵袭试验)后, 以4%聚甲醛30 min和0.1%结晶紫20 min固定和

染色, 显微镜下计数并进行统计。

1.3 统计学处理 使用SPSS 22.0统计软件进行数据的统计分析, *LMNB1* mRNA表达水平、相对细胞增殖活性、集落形成数量为符合正态分布的计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 肝癌患者生存曲线采用Kaplan-Meier分析方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA数据库分析 对TCGA数据库中369个肝癌样本以及160个癌旁正常肝组织样本的分析表明, 肝癌组织中*LMNB1* mRNA表达水平显著高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Kaplan-Meier生存曲线表明, *LMNB1*高表达患者的预后较*LMNB1*低表达患者差($P = 0.003$)。见图1A、1B。

2.2 *LMNB1*在正常人肝细胞系及各肝癌细胞系中的表达 相对正常人肝细胞系, 肝癌细胞中*LMNB1* mRNA表达量分别为MHCC97H: 1.80 ± 0.10 ($t = 11.08$, $P < 0.001$); SUN475: 1.29 ± 0.03 ($t = 5.88$, $P = 0.004$); HepG2: 2.97 ± 0.04 ($t = 39.68$, $P < 0.001$); PLC/Prf/5: 1.74 ± 0.04 ($t = 14.51$, $P < 0.001$); HuH7: 1.70 ± 0.02 ($t = 15.22$, $P < 0.001$); SK-HEP-1: 1.59 ± 0.05 ($t = 11.17$, $P < 0.001$); Hep3B: 2.27 ± 0.09 ($t = 18.50$, $P < 0.001$); 以上肝癌细胞系中*LMNB1*表达均显著高于正常人肝细胞系, 与TCGA数据库分析结果一致, 见图1C。以上结果表明*LMNB1*在肝癌组织及肝癌细胞系中表达上调, 表明*LMNB1*表达具有促进肝癌发生及进展的作用。

2.3 在肝癌细胞系中敲低或过表达*LMNB1*及Western blot验证 Western blot结果显示在HepG2及Hep3B细胞系中, 与siScramble阴性对照组相比, 转染si*LMNB1*实验组的*LMNB1*表达水平显著降低(HepG2: 0.60 ± 0.10 vs 1.60 ± 0.10 , $t = 11.55$,

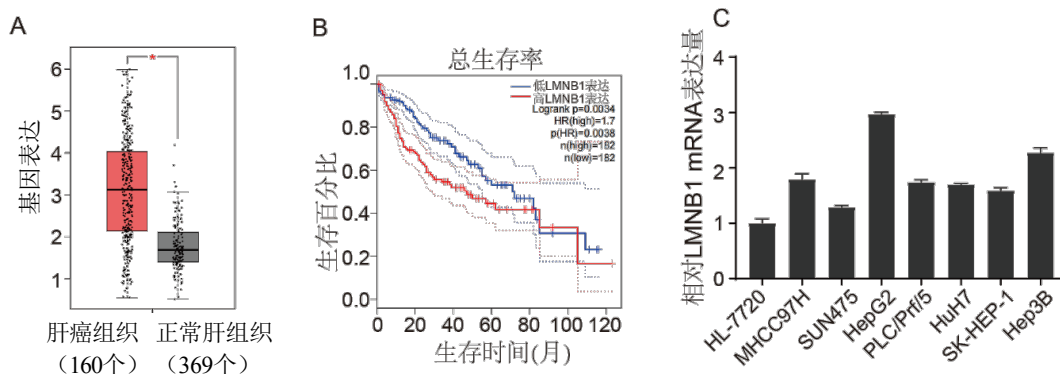


图1 *LMNB1*在肝癌细胞中表达上调

注: A图示TCGA数据库肝癌组织中*LMNB1* mRNA表达水平较癌旁正常组织高; B图示TCGA数据库分析表明*LMNB1*高表达肝癌患者预后较差; 虚线表示生存曲线95%置信区间; C图为qPCR检测提示与正常肝细胞系HL-7720相比, 各肝癌细胞系中*LMNB1*表达均显著上调。

$P < 0.001$; Hep3B: 0.40 ± 0.10 vs 1.70 ± 0.10 , $t = 15.61$, $P < 0.001$), 见图2A、2B, 说明HepG2及Hep3B细胞siLMNB1实验组有效地敲低了LMNB1。而SUN475中转染质粒后LMNB1表达显著增加 (0.70 ± 0.20 vs 0.07 ± 0.04 , $t = 5.54$, $P = 0.005$), 见图2C, 表明SUN475细胞成功实现了LMNB1过表达。

2.3 LMNB1对肝癌细胞增殖活性的影响 敲低LMNB1后, 培养96 h, 与对照组相比, Hep3B ($t = 8.86$, $P < 0.001$) 及HepG2 ($t = 13.67$, $P < 0.001$) 细

胞活性显著抑制; 而在SUN475中过表达LMNB1后, 实验组细胞增殖活性显著增加 ($t = 3.99$, $P = 0.016$), 提示LMNB1在肝癌细胞增殖中发挥重要作用。见图3、表1。

2.4 LMNB1对肝癌细胞克隆形成的影响 在HepG2及Hep3B细胞系中敲低LMNB1后, 细胞克隆形成数显著减少 [HepG2: (90.30 ± 7.24) 个 vs (382.01 ± 25.27) 个, $t = 19.24$, $P < 0.001$; Hep3B: (128.03 ± 8.24) 个 vs (395.85 ± 28.27) 个, $t =$

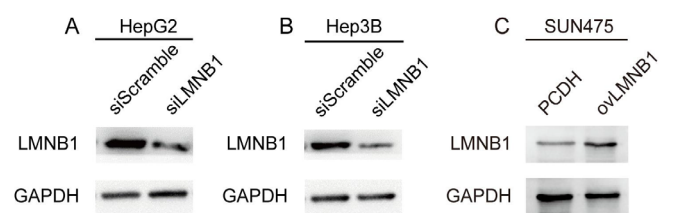


图2 Western blot 验证 HepG2、Hep3B 及 SUN475 细胞系中 LMNB1 蛋白的敲低或过表达

注: A 为 HepG2 细胞转染 siLMNB1 后 LMNB1 表达水平显著降低 (0.60 ± 0.10 vs 1.60 ± 0.10 , $t = 11.55$, $P < 0.001$), siScramble 代表阴性对照组, siLMNB1 代表实验组; B 为 Hep3B 细胞转染 siLMNB1 后 LMNB1 表达水平显著降低 (0.40 ± 0.10 vs 1.70 ± 0.10 , $t = 15.61$, $P < 0.001$), siScramble 代表阴性对照组, siLMNB1 代表实验组; C 为 SUN475 细胞转染 ovLMNB1 后 LMNB1 表达水平显著升高 (0.70 ± 0.20 vs 0.07 ± 0.04 , $t = 5.54$, $P = 0.005$), ovLMNB1 代表实验组, PCDH 代表阴性对照组。

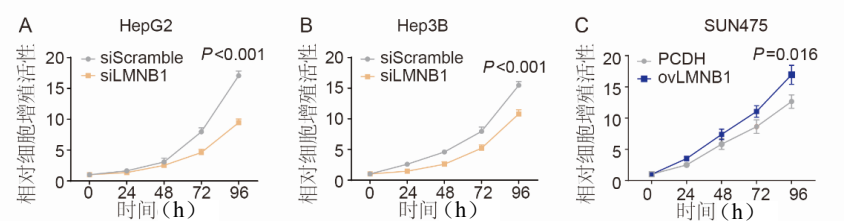


图3 LMNB1 基因对肝癌细胞增殖活性的影响

注: A 为 HepG2 细胞转染 siLMNB1 实验组细胞增殖活性显著降低; B 为 Hep3B 细胞转染 siLMNB1 实验组细胞增殖活性显著降低; C 为 SUN475 细胞转染 ovLMNB1 实验组细胞增殖活性显著增加。

| 表 1 不同肝癌细胞不同时间点相对细胞增殖活性 ($\bar{x} \pm s$) | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 肝癌细胞 | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| HepG2 | | | | | |
| siScramble | 1.00 ± 0.21 | 1.64 ± 0.33 | 3.08 ± 0.62 | 7.97 ± 0.65 | 17.08 ± 0.75 |
| siLMNB1 | 1.00 ± 0.05 | 1.35 ± 0.11 | 2.53 ± 0.30 | 4.60 ± 0.53 | 9.45 ± 0.61 |
| t值 | 0.00 | 1.43 | 1.38 | 6.93 | 13.67 |
| P值 | > 0.999 | 0.225 | 0.240 | 0.002 | < 0.001 |
| Hep3B | | | | | |
| siScramble | 1.00 ± 0.05 | 2.59 ± 0.19 | 4.59 ± 0.28 | 7.95 ± 0.70 | 15.48 ± 0.62 |
| siLMNB1 | 1.00 ± 0.08 | 1.46 ± 0.25 | 2.60 ± 0.40 | 5.21 ± 0.54 | 10.81 ± 0.67 |
| t值 | 0.00 | 6.22 | 7.12 | 5.37 | 8.86 |
| P值 | > 0.999 | 0.003 | 0.002 | 0.006 | < 0.001 |
| SUN475 | | | | | |
| PCDH | 1.00 ± 0.05 | 2.50 ± 0.26 | 5.82 ± 0.83 | 8.63 ± 1.10 | 12.65 ± 1.06 |
| ovLMNB1 | 1.00 ± 0.02 | 3.52 ± 0.40 | 7.39 ± 0.83 | 11.06 ± 0.92 | 16.94 ± 1.52 |
| t值 | 0 | 4.03 | 2.32 | 2.95 | 3.99 |
| P值 | > 0.999 | 0.016 | 0.081 | 0.042 | 0.016 |

注: siScramble 代表阴性对照组, siLMNB1 代表敲低 LMNB1 表达实验组; ovLMNB1 代表过表达 LMNB1 表达实验组, PCDH 代表阴性对照组。

15.76, $P < 0.001$], 在SUN475中, 过表达*LMNB1*组比对照组克隆形成个数显著增加 [(467.82 ± 42.45) 个 vs (85.31 ± 15.32) 个, $t = 14.87$, $P = 0.001$]. 以上结果表明, *LMNB1*可显著增强肝癌细胞克隆形成能力, 见图4。

2.5 *LMNB1*基因对肝癌细胞侵袭迁移的影响 在HepG2及Hep3B细胞系中敲低*LMNB1*后, 肝癌细胞迁移的数量显著减少 [HepG2: (75.25 ± 8.10) 个 vs (15.02 ± 3.50) 个, $t = 11.90$, $P < 0.001$; Hep3B: (168.20 ± 12.26) 个 vs (34.83 ± 7.61) 个, $t = 15.96$, $P < 0.001$], 侵袭的细胞数量同样显著减少 [HepG2: (110.21 ± 12.01) 个 vs (25.76 ± 4.03) 个, $t = 11.50$, $P < 0.001$; Hep3B: (150.22 ± 15.16) 个 vs (22.03 ± 14.26) 个, $t = 10.65$, $P < 0.001$]; 在SUN475中, 过表达*LMNB1*组比对照组细胞迁移数量显著增加 [(50.11 ± 5.55) 个 vs (349.85 ± 25.26) 个, $t = 11.33$, $P < 0.001$], 侵袭的细胞数量同样显著增加 [(40.11 ± 5.26) 个 vs (80.13 ± 12.20) 个, $t = 5.21$, $P = 0.007$]. 以上结果表明, *LMNB1*对肝癌细胞侵袭和迁移能力具有重要作用, 见图5。

2.6 *LMNB1*基因对肝癌细胞AKT及MAPK信号转导通路的影响 与对照组相比, 敲低*LMNB1*后, AKT的磷酸化活性形式p-AKT表达水平显著下降, 而过表达*LMNB1*可导致p-AKT表达升高。而敲低或过表达*LMNB1*后, p-ERK表达水平无显著变化, AKT和ERK的本底表达水平均未发生明显变化, 见图6、表2。

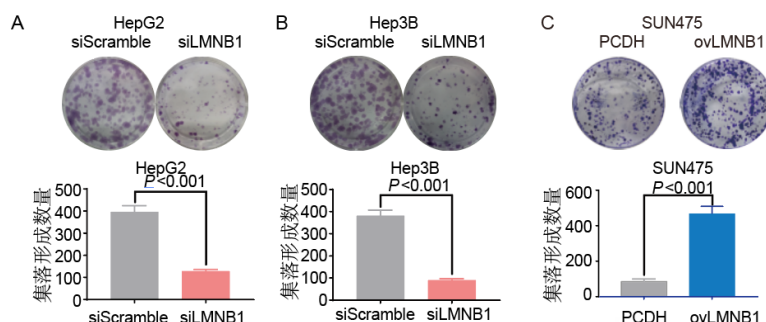


图4 *LMNB1*基因对细胞克隆形成能力的影响

注: A为HepG2细胞转染siLMNB1后细胞克隆形成能力显著降低 [(90.30 ± 7.24) 个 vs (382.01 ± 25.27) 个, $t = 19.24$, $P < 0.001$]; B为Hep3B细胞转染siLMNB1后细胞克隆形成能力显著降低 [(128.03 ± 8.24) 个 vs (395.85 ± 28.27) 个, $t = 15.76$, $P < 0.001$]; C为SUN475细胞过表达*LMNB1*后细胞克隆形成能力显著升高 [(467.82 ± 42.45) 个 vs (85.31 ± 15.32) 个, $t = 14.87$, $P = 0.001$].

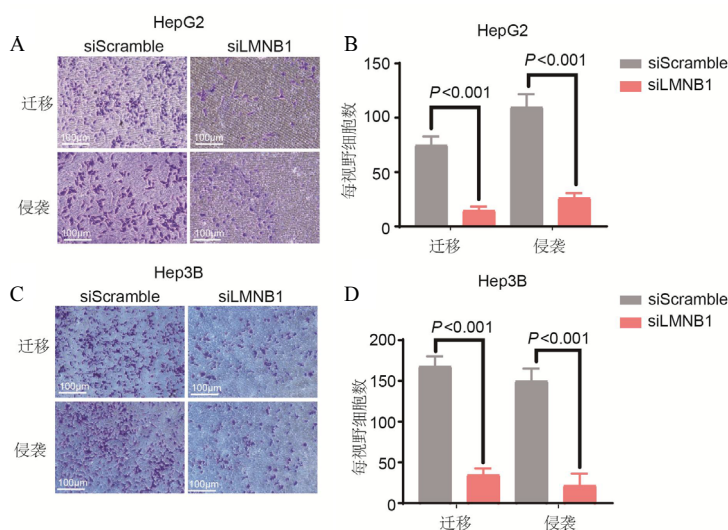
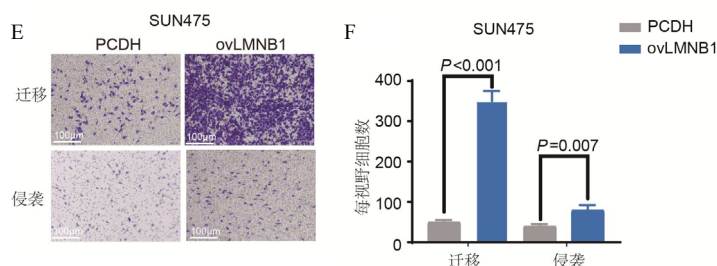
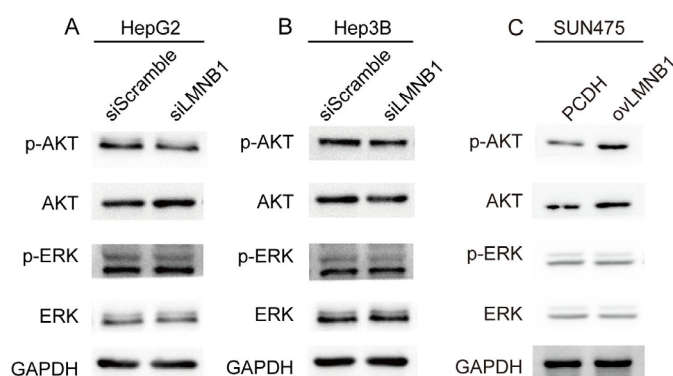


图5 *LMNB1*对肝癌细胞侵袭和迁移能力的影响(结晶紫染色)

注: A、B为HepG2细胞转染siLMNB1实验组细胞侵袭及迁移能力显著降低, 迁移: (75.25 ± 8.10) 个 vs (15.02 ± 3.50) 个, $t = 11.90$, $P < 0.001$; 侵袭: (110.21 ± 12.01) 个 vs (25.76 ± 4.03) 个, $t = 11.50$, $P < 0.001$; C、D为Hep3B细胞转染siLMNB1实验组侵袭及迁移能力显著降低, 迁移: (168.20 ± 12.26) 个 vs (34.83 ± 7.61) 个, $t = 15.96$, $P < 0.001$, 侵袭: (150.22 ± 15.16) 个 vs (22.03 ± 14.26) 个, $t = 10.65$, $P < 0.001$; E、F为SUN475细胞过表达*LMNB1*实验组侵袭及迁移细胞显著增多, 迁移: (50.11 ± 5.55) 个 vs (349.85 ± 25.26) 个, $t = 11.33$, $P < 0.001$, 侵袭: (40.11 ± 5.26) 个 vs (80.13 ± 12.20) 个, $t = 5.21$, $P = 0.007$ 。

续图 5 *LMNB1* 对肝癌细胞侵袭和迁移能力的影响 (结晶紫染色)

注: A、B 为 HepG2 细胞转染 si*LMNB1* 实验组细胞侵袭及迁移能力显著降低, 迁移: (75.25 ± 8.10) 个 vs (15.02 ± 3.50) 个, $t = 11.90$, $P < 0.001$; 侵袭: (110.21 ± 12.01) 个 vs (25.76 ± 4.03) 个, $t = 11.50$, $P < 0.001$; C、D 为 Hep3B 细胞转染 si*LMNB1* 实验组侵袭及迁移能力显著降低, 迁移: (168.20 ± 12.26) 个 vs (34.83 ± 7.61) 个, $t = 15.96$, $P < 0.001$, 侵袭: (150.22 ± 15.16) 个 vs (22.03 ± 14.26) 个, $t = 10.65$, $P < 0.001$; E、F 为 SUN475 细胞过表达 *LMNB1* 实验组侵袭及迁移细胞显著增多, 迁移: (50.11 ± 5.55) 个 vs (349.85 ± 25.26) 个, $t = 11.33$, $P < 0.001$, 侵袭: (40.11 ± 5.26) 个 vs (80.13 ± 12.20) 个, $t = 5.21$, $P = 0.007$ 。

图 6 Western blot 检测 *LMNB1* 表达对 HepG2、Hep3B 及 SUN475 细胞系中 AKT 信号转导通路的影响

注: A 图示敲低 *LMNB1* 可显著降低 HepG2 细胞系的 p-AKT 表达水平, 而不影响 AKT 蛋白、p-ERK 蛋白及 ERK 蛋白的表达水平; B 图示敲低 *LMNB1* 可显著降低 Hep3B 细胞系 p-AKT 表达水平, 而不影响 AKT 蛋白、p-ERK 蛋白及 ERK 蛋白的表达水平; C 图示过表达 *LMNB1* 可显著提高 SUN475 细胞系 p-AKT 表达水平, 而不影响 AKT 蛋白、p-ERK 蛋白及 ERK 蛋白的表达水平; p-AKT 为磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B), AKT 为蛋白激酶 B (protein kinase B), p-ERK 为磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinases), ERK 为细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases); GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)。

表 2 *LMNB1* 对各肝癌细胞系 AKT 信号转导通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 肝癌细胞 | p-AKT/GAPDH | AKT/GAPDH | p-ERK/GAPDH | ERK/GAPDH |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| HepG2 | | | | |
| siScramble | 1.11 ± 0.20 | 1.30 ± 0.20 | 1.40 ± 0.10 | 1.11 ± 0.20 |
| siLMNB1 | 0.40 ± 0.1 | 1.20 ± 0.12 | 1.32 ± 0.15 | 1.10 ± 0.20 |
| <i>t</i> 值 | 7.32 | 0.90 | 0.87 | 0 |
| <i>P</i> 值 | 0.002 | 0.418 | 0.432 | > 0.999 |
| Hep3B | | | | |
| siScramble | 1.30 ± 0.20 | 1.20 ± 0.20 | 1.30 ± 0.20 | 1.25 ± 0.15 |
| siLMNB1 | 0.12 ± 0.07 | 1.10 ± 0.08 | 1.30 ± 0.30 | 1.18 ± 0.26 |
| <i>t</i> 值 | 12.35 | 0.97 | 0.00 | 0.40 |
| <i>P</i> 值 | < 0.001 | 0.388 | > 0.999 | 0.707 |
| SUN475 | | | | |
| PCDH | 0.08 ± 0.10 | 0.49 ± 0.10 | 0.33 ± 0.03 | 0.29 ± 0.30 |
| ovLMNB1 | 0.49 ± 0.10 | 0.60 ± 0.02 | 0.31 ± 0.03 | 0.19 ± 0.20 |
| <i>t</i> 值 | 5.58 | 1.60 | 0.15 | 0.44 |
| <i>P</i> 值 | 0.005 | 0.185 | 0.888 | 0.681 |

3 讨论

肝癌是一种成因复杂、进展迅速的癌症,极易转移,复发率极高^[17],然而其发病机制尚不完全清楚。因此,了解肝癌的潜在分子机制对于更好的诊断、治疗和预后预测至关重要。

LMNB1是核纤层的重要组成部分,为核膜提供结构支持,并通过调节染色质、DNA的复制、修复和转录参与调控基因的表达^[14,18]。LMNB1上游基因组缺失,最终导致LMNB1表达上调,也已被证实会引起成人遗传性脑白质营养不良^[19]。也有研究表明,LMNB1在一些癌症,如前列腺癌、胰腺癌等中高表达^[20,21],这与本研究结果相符,通过对TCGA数据库分析发现LMNB1在肝癌组织中表达比癌旁正常组织高,而且LMNB1表达水平与肝癌患者预后呈现负相关。不仅如此,本研究还比较了正常人肝细胞系与各肝癌细胞系,进一步验证LMNB1的表达水平在肝癌中确实存在上调。尽管有许多研究报道了LMNB1在癌症中的异常表达^[15],但针对LMNB1影响肝癌进展的具体机制尚未完全明确。本研究为进一步明确LMNB1对肝癌的作用,敲低LMNB1后检测肝癌细胞的增殖及迁移侵袭能力,结果显示,敲低LMNB1可减弱肝癌细胞的增殖及迁移侵袭能力。这与在胰腺癌中的相关研究结果一致,该研究还表明,敲低LMNB1可减少胰腺癌细胞的增殖、侵袭及肿瘤发生,LMNB1阳性表达与低分化和高转移潜力密切相关^[22]。上述结果充分说明了LMNB1对肝癌发生发展中的重要作用。

在大多数人类癌症中,磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号转导通路被激活。PI3K/AKT通路是由细胞外生长因子(epidermal growth factor, EGF)与跨膜受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)结合激活的,在调节细胞增殖、黏附、转移、分化和代谢方面发挥重要作用,其失调常常导致包括癌症在内的多种疾病^[1,23,24]。PI3K/AKT信号转导通路异常激活存在于许多癌症中,该通路也被认为是有效的治疗靶点^[25-27]。目前已有许多研究专注于PI3K/AKT信号转导通路的小分子抑制剂在临床上的应用,部分PI3K及其下游哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂已被批准用于临床治疗^[23,28]。本研究为进一步探究LMNB1促进肝癌进展的机制,对PI3K/AKT信号转导通路及MAPK/ERK信号转导通路进行检测,结果显示敲低LMNB1后,AKT及ERK的本底水平无明显变化,而AKT的活化形式p-AKT

表达水平显著降低,即敲低LMNB1后PI3K/AKT信号转导通路的激活被显著抑制,而MAPK信号转导通路无显著变化。因此,有理由认为LMNB1可通过活化AKT信号转导通路促进肝癌进展,LMNB1具有作为肝癌新型治疗靶点的巨大发展潜力。

综上所述,LMNB1可通过激活PI3K/AKT信号转导通路促进肝癌细胞的增殖及迁移侵袭,进而促进肝癌的发生及进展,LMNB1可能成为新的肝癌治疗靶点,有助于提高肝癌患者治愈率并改善患者预后。

参考文献

- [1] WU Z H, LI C, ZHANG Y J, et al. Bioinformatics study revealed significance of exosome transcriptome in hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 813701.
- [2] 李世思, 郭志唐, 陈章彬, 等. 晚期肝细胞癌系统治疗的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(12): 2943-2946.
- [3] 郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 等. 2016年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(3): 212-220.
- [4] LIU Z, JIANG Y, YUAN H, et al. The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: results from the global burden of disease study 2016 and implications for liver cancer prevention[J]. J Hepatol, 2019, 70(4): 674-683.
- [5] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(10): 589-604.
- [6] ORCUTT S T, ANAYA D A. Liver resection and surgical strategies for management of primary liver cancer[J]. Cancer Control, 2018, 25(1): 1073274817744621.
- [7] 中华医学会肝病学会肝病学组. HBV/HCV相关肝细胞癌抗病毒治疗专家共识(2021年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(10): 2292-2302.
- [8] MASSARWEH N N, EL-SERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Cancer control, 2017, 24(3): 1073274817729245.
- [9] RAOUL J L, FORNER A, BOLONDI L, et al. Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: how and when to use it based on clinical evidence[J]. Cancer Treat Rev, 2019, 72: 28-36.
- [10] 贾哲, 赫嵘, 黄容海, 等. 同期肝癌射频消融联合Hassab手术对肝细胞癌合并门静脉高压患者细胞免疫功能的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(3): 61-67.
- [11] JIANG Y, HAN Q J, ZHANG J. Hepatocellular carcinoma: mechanisms of progression and immunotherapy[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(25): 3151-3167.
- [12] ZHANG C, LI Y, LIU B, et al. Discovery of SIRT7 inhibitor as new therapeutic options against liver cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 9: 813233.
- [13] 李豪, 陈国勇, 魏思东, 等. 原发性肝癌患者肝切除术后复发影响因素分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(3): 69-74.
- [14] ZHANG J, CAI A, ZHAO Y. Three circRNAs function as potential biomarkers for colorectal cancer[EB/OL]. (2020-12-01)[2022-02-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33337836/>.
- [15] YANG Z, SUN Q, GUO J, et al. GRSF1-mediated MIR-G-1 promotes malignant behavior and nuclear autophagy by directly

- upregulating TMED5 and LMNB1 in cervical cancer cells[J]. Autophagy,2019,15(4):668-685.
- [16] CRISTOFOLI F, MOSS T, MOORE H W, et al. De novo variants in LMNB1 cause pronounced syndromic microcephaly and disruption of nuclear envelope integrity[J]. Am J Hum Genet,2020,107(4):753-762.
- [17] WANG J, HE H, JIANG Q, et al. CBX6 promotes HCC metastasis via transcription factors Snail/Zeb1-mediated EMT mechanism[J]. Onco Targets Ther,2020,13:12489-12500.
- [18] MURRAY-NERGER L A, JUSTICE J L, REKAPALLI P, et al. Lamin B1 acetylation slows the G1 to S cell cycle transition through inhibition of DNA repair[J]. Nucleic Acids Res,2021,49(4):2044-2064.
- [19] GIORGIO E, SIRCHIA F, BOSCO M, et al. A novel case of Greenberg dysplasia and genotype-phenotype correlation analysis for LBR pathogenic variants: an instructive example of one gene-multiple phenotypes[J]. Am J Med Genet A,2019,179(2):306-311.
- [20] DENAIS C M, GILBERT R M, ISERMANN P, et al. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration[J]. Science,2016,352(6283):353-358.
- [21] CHODARY KHAMENEH S, RAZI S, SHAMDANI S, et al. Weighted correlation network analysis revealed novel long non-coding RNAs for colorectal cancer[J]. Sci Rep,2022,12(1):2990.
- [22] PADIATH Q S, SAIGOH K, SCHIFFMANN R, et al. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy[J]. Nat Genet,2006,38(10):1114-1123.
- [23] SONG M, BODE A M, DONG Z, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. Cancer Res,2019,79(6):1019-1031.
- [24] YU Y, WANG M, CHEN R, et al. Gypenoside XVII protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting ER stress-induced mitochondrial injury[J]. J Ginseng Res,2021,45(6):642-653.
- [25] ALZAHIRANI A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside[J]. Semin Cancer Biol,2019,59:125-132.
- [26] SHARIATI M, MERIC-BERNSTAM F. Targeting AKT for cancer therapy[J]. Expert Opin Investig Drugs,2019,28(11):977-988.
- [27] 孙巍, 丁晓燕, 陈京龙, 等. MicroRNA-520a通过失活AKT抑制HepG2.2.15细胞中HBV DNA复制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2018,10(4):73-78.
- [28] LI W, LI X, LI X, et al. Lamin B1 Overexpresses in lung adenocarcinoma and promotes proliferation in lung cancer cells via AKT pathway[J]. Onco Targets Ther,2020,13:3129-3139.

收稿日期: 2022-02-08

展沙沙, 范琪琪, 李雪. 敲低核纤层蛋白B1通过抑制PI3K/AKT通路在肝癌中发挥抑癌作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023,15(3): 6-15.